



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :</b> <b>C07K 1/06, 1/04</b> <b>C07C 271/22</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 92/22566</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Dezember 1992 (23.12.92)</b>		
<table style="width: 100%; border: none;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP92/01280 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. Juni 1992 (05.06.92)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 41 19 544.2      13. Juni 1991 (13.06.91)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> BARTL, Ralf [DE/DE]; FRANK, Ronald [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BOETERS, Hans, D.; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).</td><td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></td></tr></table>			<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP92/01280 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. Juni 1992 (05.06.92)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 41 19 544.2      13. Juni 1991 (13.06.91)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> BARTL, Ralf [DE/DE]; FRANK, Ronald [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BOETERS, Hans, D.; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP92/01280 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. Juni 1992 (05.06.92)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 41 19 544.2      13. Juni 1991 (13.06.91)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> BARTL, Ralf [DE/DE]; FRANK, Ronald [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BOETERS, Hans, D.; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), MC (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>			
<b>(54) Title: PROTECTED AMINO-ACID UNIT, ITS PREPARATION AND ITS USE</b>  <b>(54) Bezeichnung: GESCHÜTZTER AMINOSÄUREBAUSTEIN, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG</b>  <b>(57) Abstract</b>  The invention concerns an amino-acid unit for use in peptide synthesis in which a hydrogen atom of the amino group entering into a peptide bond is protected by a temporary amino protection group which can be cleaved under non-acid conditions. It is characterized in that the second hydrogen atom of this amino group is protected by a further protection group which can be introduced by a Mannich reaction. The invention also relates to a method of preparing the said amino-acid unit and to its use in peptide synthesis.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft einen Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgruppe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist; die Erfindung betrifft zudem ein Verfahren zur Herstellung des obengenannten Aminosäurebausteins und die Verwendung davon bei der Peptidsynthese.				

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

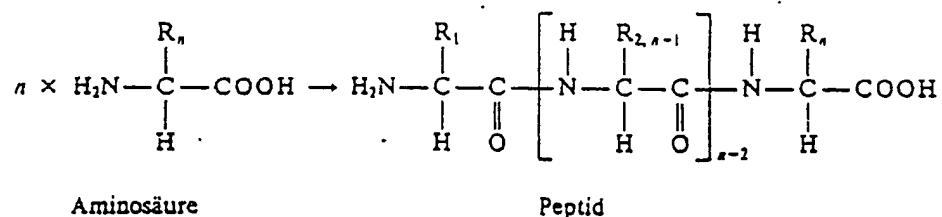
Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

## Geschützter Aminosäurebaustein. Herstellung und Verwendung

In der molekularbiologischen und medizinischen Forschung sind chemisch synthetisierte Peptide (Oligo- und Polypeptide) zu einem wichtigen Hilfsmittel geworden. Sie werden eingesetzt zur Herstellung spezifischer Antikörper für Immunaффinitätschromatographie, Identifizierung unbekannter Genprodukte und Entwicklung von Vaccinen gegen Krankheitserreger, als Peptidhormone und deren Analoga mit agonistischer oder antagonistischer Wirkung, als Modellverbindungen in Proteinstrukturuntersuchungen u.v.a.

Diese Peptide sind über Amidbindungen (Peptidbindungen) verknüpfte Oligo- bzw. Polymere ( $n$  bis etwa 150) von Aminosäuren.



Im folgenden werden unter Peptiden auch solche verstanden, die außer den 20 natürlichen L- $\alpha$ -Aminosäuren auch Nicht- $\alpha$ -, D- bzw. chemisch modifizierte Aminosäuren (beliebiges R) enthalten. Die chemische Synthese der Peptide erfolgt stufenweise durch Verknüpfung (Kopplung) geeignet geschützter Aminosäure-, Di- oder Oligopeptidbausteine. Verschiedene Syntheseverfahren, die

sich in der Art der Schutzgruppen und der Chemie der Bindungsknüpfung unterscheiden, gehören zum Stand der Technik. Einen Überblick geben:

- R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)
- E. Wünsch et al. in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, 4. Auflage, Band 15 (E. Müller, Herausgeber) Thieme, Stuttgart, 1974;
- G. Barany, R. B. Merrifield, The Peptides, Vol. 2 (E. Gross, J. Meienhofer, Eds) Academic Press, New York, 1979, p. 1

Im Verlauf vieler Synthesen kann es zu problematischen Abschnitten kommen, von denen an die Kopplungsausbeute rapide sinkt. Bei einzelnen Peptiden kann dies bereits nach sehr wenigen Kopplungen eintreten (schwierige Sequenzen). Verantwortlich für dieses Phänomen ist in erster Linie die Faltung der Peptidkette zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken. Die N-terminalen Aminofunktionen sind dann für eine chemische Reaktion nicht mehr vollständig zugänglich. An der Faltung der Peptide sind die Amidprotonen der Peptidbindung maßgeblich beteiligt. (R. C. de L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, J. Am. Chem. Soc., 112, 6039 (1990)).

Bisher sind schon eine Reihe von Versuchen unternommen worden, die Ausbildung der  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu vermeiden. Neben der Variation von Temperatur, Lösungsmittel und geringere Trägerbeladungen wurden auch verschiedene Zusätze wie Salze oder Harnstoff während der Synthese getestet (z. B. F. C. Westall, A. B. Robinson, J. Org. Chem., 35, 2842 (1970) und R. C. de L. Milton et al. 1990, s.o.).

Das wirkungsvollste aber auch schwierigste Konzept zur Vermeidung der Wasserstoffbrücken setzt auf die chemische Modifizierung der Aminosäure mit einer zusätzlichen Schutzgruppe für das zweite N-, insbesondere  $\alpha$ N-Proton (H. Eckert, C. Seidel, Angew.

Chem., 98, 168 (1986)). Eine wichtige Voraussetzung für die Syntheseeseignung ist die Ortogonalität der neuen Schutzgruppe zu den bereits verwendeten. Außerdem sollte sie keinen negativen Einfluß (sterisch oder elektronisch) auf die Aminofunktion haben. Diese Schutzgruppe bleibt dann während der Synthese erhalten und wird erst nach dem Aufbau des vollständigen Peptids abgespalten.

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese gelöst, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, wobei dieser Baustein dadurch gekennzeichnet ist,

(a) daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgruppe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist, und

(b), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Dipeptidbaustein handelt, auch das Wasserstoff-Atom der Peptidbindung durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein kann, oder

(c), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Oligopeptidbaustein handelt, auch ein bis alle Wasserstoff-Atome der Peptidbindungen durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein können.

Bei dem erfindungsgemäßen Aminosäurebaustein kann es sich um einen Baustein für eine einzelne Aminosäure, um einen Dipeptidbaustein oder um einen Oligopeptidbaustein handeln.

Bei der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe kann es sich um eine  $\alpha$ - oder  $\beta$ -ständige Aminogruppe handeln.

Bei der temporären Aminoschutzgruppe kann es sich um eine Urethangruppe handeln, beispielsweise Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).

Die Carboxylgruppe des Aminosäurebausteins kann frei, ebenfalls geschützt oder aktiviert (Aktivester) vorliegen.

Der erfindungsgemäße Aminosäurebaustein kann durch eine weitere Schutzgruppe ( $R'''-X-CH_2-$ ) gekennzeichnet sein, die unter Verwendung von Formaldehyd und einer H-aziden Verbindung ( $R'''-X-H$ ;  $R'''$ : Rest der Mannich-Reaktionskomponente), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise eines Alkohols ( $R'''-OH$ ), eines Thioalkohols ( $R'''-SH$ ) oder eines sekundären Amins ( $R'''-NR^ivH$ ;  $R^iv$ : weiterer Rest der Mannich-Reaktionskomponente, kein Wasserstoff), mit Hilfe der Mannich-Reaktion einführbar ist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Aminosäurebausteins für die Peptidsynthese, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man von einem üblichen Aminosäurebaustein ausgeht, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, und das andere Wasserstoff-Atom frei ist, und diesen üblichen Aminosäurebaustein einer Mannich-Reaktion unter Verwendung einer H-aziden Verbindung ( $R'''-X-H$ ), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise unter Verwendung eines Alkohols, eines Thioalkohols oder eines sekundären Amins, unterwirft.

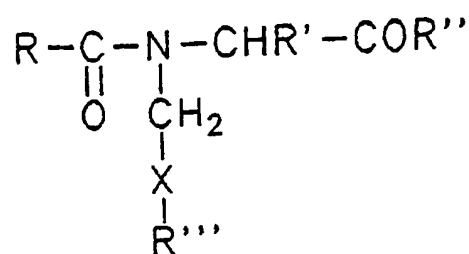
Die erfindungsgemäßen Aminosäurebausteine lassen sich zur Peptidsynthese, insbesondere zur Peptidsynthese nach Merrifield und beispielsweise nach der Fmoc-tBu-Methode verwenden.

Für das erfindungsgemäße Synthesekonzept wurden also Schutzgruppen auf der Basis aminomethylierter Verbindungen der allgemeinen Formel  $R'''-X-CH_2-$  entwickelt. Darin bedeutet X ein Heteroatom mit freiem Elektronenpaar und  $R'''$  einen beliebigen Rest der Mannich-Reaktionskomponente. Diese Schutzgruppen können sauer abgespalten werden.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Aminosäurebausteins kann man von einem üblichen Aminosäurebaustein der folgenden allgemeinen Formel ausgehen:

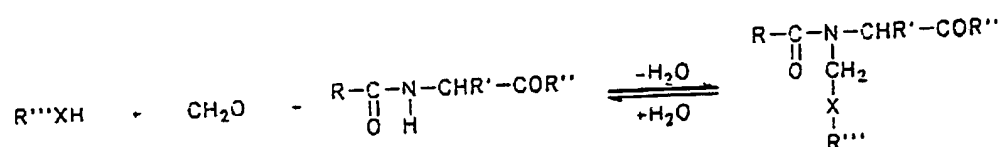


Die entstehende Aminosäure entspricht dann <sup>6</sup> -



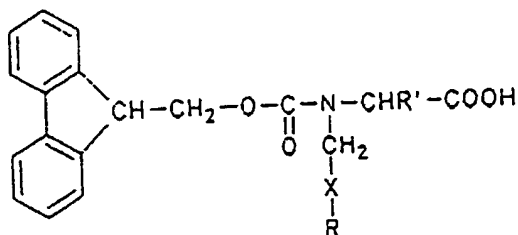
mit R-CO:  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe nach Stand der Technik, die unter nicht sauren Bedingungen abgespalten werden kann; R': Seitenkette der AS; R'': OH, Aktivester oder Schutzgruppe; R''': Rest der neuen Schutzgruppe; X: O, S, NR<sup>N</sup> (R<sup>N</sup>  $\neq$  H) etc.

Die Einführung der Schutzgruppe durch eine Mannich-Reaktion (z. B. M. Tramontini, L. Angiolini, Tetrahedron, 46, 1791 (1990) (Review)) erfolgt nach dem folgenden Schema:



Prinzipiell läßt sich eine solche Mannich-Reaktion auch mit einem vollgeschützten Di- oder Oligopeptid durchführen. Dabei wird die neue Schutzgruppe sowohl am N-Terminus, als auch an den mittelständigen Peptidbindungen eingeführt. Damit ließe sich ein in den für die Peptidsynthese verwendeten Lösungsmittel unlösliches Oligopeptidfragment in eine lösliche Form überführen. Die Abspaltung erfolgt als Rückreaktion.

Im Folgenden wird die Anwendung dieses Konzepts in der Fmoc-Strategie aufgezeigt (G. B. Fields, R. L. Noble, Int. J. Peptide Protein Res., 35, 161 (1990)).



Geschützte Fmoc-Aminosäure



Beispiele für die Variationsvielfalt der Schutzgruppen sind

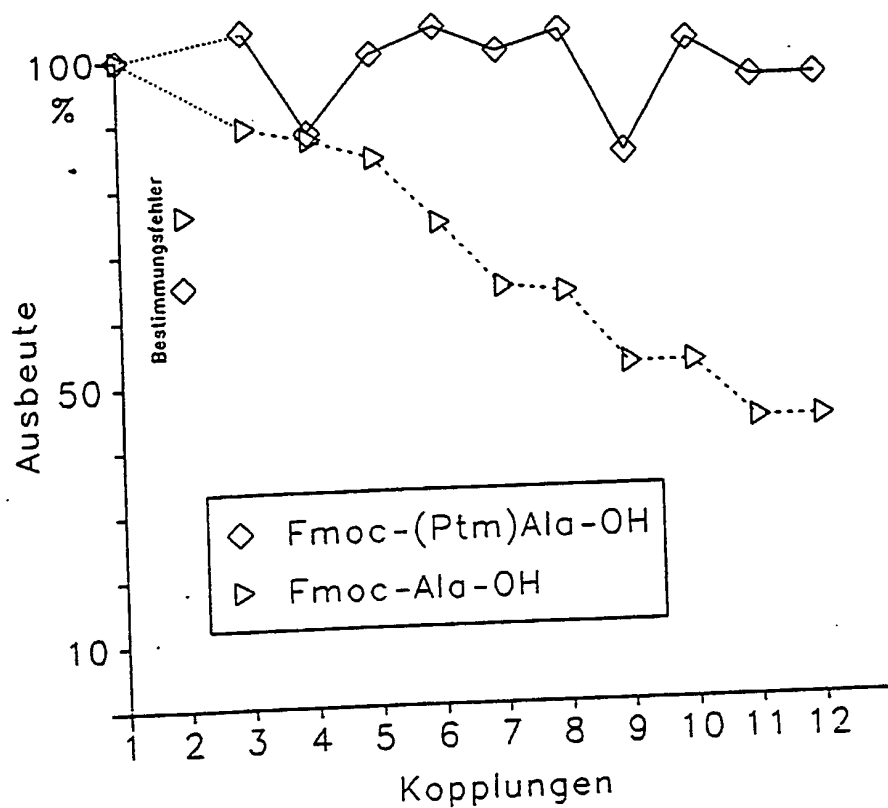
Fmoc-(Ptm)Gly-OH	Ptm: Phenylthiomethyl-
Fmoc-(Ptm)Ala-OH	
Fmoc-(Ptm)Val-OH	
Fmoc-(Etm)Ala-OH	Etm: Ethylthiomethyl-
Fmoc-(Etm)Val-OH	
Fmoc-(Mom)Gly-OH	Mom: Methyloxymethyl-
Fmoc-(Mom)Ala-OH	
Fmoc-(Bom)Val-OH	Bom: Benzyloxymethyl-

die als farblose, zähe Öle erhalten werden. Zur vereinfachten linearen Schreibweise wird die zusätzliche  $\alpha$ N-Schutzgruppe in runden Klammern vor das Symbol für die Aminosäure gesetzt.

Bei der Einführung der neuen Schutzgruppe fällt die neue Aminosäure als rotationsgehindertes Konformerengemisch der CO-N-Bindung an (Signalverdopplung im NMR-Spektrum), was aber für die Peptidsynthese nicht von Belang ist.

Die Einsetzbarkeit dieser Aminosäurederivate für die Peptidsynthese konnte durch die Darstellung eines vollständig geschützten Tripeptid gezeigt werden. Die Synthese des Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz erfolgte in Lösung.

Für die Untersuchungen der Kopplungsausbeuten im Verlauf der Synthese einer schwierigen Modelsequenz (Ala)<sub>13</sub> wurde die Festphasensynthese herangezogen. Für die zweite  $\alpha$ -N-Schutzgruppe wurde die Phenylthiomethyl-Gruppe (Ptm) gewählt. Während der Synthese mit konventionellem Fmoc-Ala-OH beobachtet man schnell einen allmählichen Ausbeuteabfall. Bei Verwendung der neuen, geschützten Aminosäure Fmoc-(Ptm)Ala-OH findet man unter gleichen Reaktionsbedingungen keine Ausbeuteverluste.



### Methoden

#### Allgemeine Darstellung der Aminosäuren

1 mmol konventionell geschützte Aminosäure (gegebenfalls als Alkalisalz mit kat. Mengen Citronensäure) werden mit ca. 3-6 fachem Überschuß Paraformaldehyd und ca. 10 fachem Überschuß H-acider Verbindung in einem gasdichten und druckstabilen Reaktionsgefäß eingeschlossen und 2 d bei 90-100 °C gerührt. Die Reinigung erfolgt durch Flüssigkeitschromatographie über C-18 Kieselgelmaterial in säurefreiem Acetonitril/Wassergradienten.

**Darstellung von Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz****Fmoc-(Mom)Gly-OLi**

Fmoc-Gly-OH wird vorteilhaft als Lithiumsalz für die o. a. Vorschrift eingesetzt. Fmoc-(Mom)Gly-OLi wird nahezu quantitativ erhalten.

MS:  $C_{19}H_{19}NO_5$  (341) EI: m/e (%) = 341 (1,  $M^+$ ), 30 (2,  $M^+ - CH_3OH$ ), 266 (<1,  $309 - CO_2 + H^+$ ), 178 (100, Fluorenyl)

**Fmoc-(Mom)Gly-Val-OBz**

48,6  $\mu$ mol Fmoc-(Mom)Gly-OLi und 50  $\mu$ mol HOBt werden in 200  $\mu$ l DMF gelöst und mit 48,6  $\mu$ mol DIPC 15 min voraktiviert. 121  $\mu$ mol H-Val-OBz·HCl und 100  $\mu$ mol DMAP werden in 200  $\mu$ l DMF gelöst und beide Lösungen vereinigt. Nach 1 h wird mit etwas Wasser versetzt und die Lösung im Vakuum eingedampft. Trennung durch Flüssigkeitschromatographie mit Acetonitril/Wasser über C-18 Kieselgel ergibt ca. 50 % Dipeptid.

MS:  $C_{31}H_{34}N_2O_6$  (530) FAB+: m/e (%) = 553 (1,  $M^+ + Na$ ), 531 (1,  $M^+$ ), 499 (12,  $M - CH_3O^-$ ), 277 (10, 499-Fmoc), 179 (Fluorenyl)

**H-(Mom)Gly-Val-OBz**

Das Fmoc geschützte Dipeptid wird mit ca. 300  $\mu$ l 20% Piperidin/DMF 20 min behandelt und nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum w. o. chromatographisch getrennt (quantitativ).

MS:  $C_{16}H_{24}N_2O_4$  (308) FAB+: m/e = 277 (9,  $M - CH_3O^-$ ), 265 (100, 277- $CH_2$ )

**Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz**

70  $\mu$ mol Fmoc-(Mom)Gly-OLi werden mit 2 eq. HOBt und 1,1 eq. DIPC in 200  $\mu$ l DMF 15 min voraktiviert und mit 23  $\mu$ mol Dipeptid/200  $\mu$ l DMF versetzt. Nach einer Stunde wird mit etwas Wasser versetzt und für die Analytik durch HPLC getrennt.

MS:  $C_{35}H_{41}N_3O_8$  (631) FAB+: m/e = 556 (88,  $M^+ + 2H - Phenyl$ ), 334 (100, 556-Fluorenyl)

**Darstellung der Ptm-AS Fmoc-(Ptm)Ala-OH**

109,7 mg (0,33 mmol) Fmoc-Ala-OH·H<sub>2</sub>O, 50 mg (1,56 mmol) Paraformaldehyd und 400

$\mu$ l Thiophenol werden wie oben umgesetzt. Chromatographie ergibt 40% Produkt als farbloses, zähes Öl.

MS:  $C_{25}H_{23}NO_4S$  (433) FAB+:  $m/e = 456$  (1,  $M^+ + Na$ ),  $434$  (2,  $M + H^+$ ),  $324$  (13,  $M^-$ -Thiophenyl),  $179$  (100, Fluorenyl)

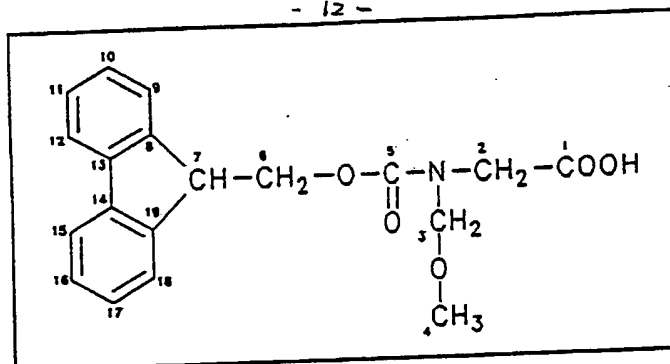
Die Synthese des  $(Ala)_{13}$  erfolgte auf Cellulose-Disks mit säurelabilem Benzyllinker (R. Frank, R. Döring, Tetrahedron, 44, 6031 (1988)), die bereits mit Fmoc-Ala-OH beladen waren. Die Kopplung der übrigen AS erfolgte in 20 mM Aminosäurelösung mit ca. 4-fachem Überschuß zur Filterbeladung in DMF.

Je 1 eq. der entsprechenden Aminosäure wurde mit 1,5 eq. HOBt und 1,2 eq. DIPC 15 min voraktiviert und auf die mit 10  $\mu$ l Bromphenolblaulsg. (1 mg/1 ml DMF) angefärbten Filter gegeben. Nach einer Stunde Schwenken der Filter in der Reaktionslg. wurden die noch gefärbten Filter mit je DMF,  $CH_2Cl_2$ , DMF je dreimal gewaschen und erneut eine Stunde mit Aminosäurelg. behandelt. Noch gefärbte Filter wurden nach erneutem Waschen mit 30  $\mu$ l  $Ac_2O$ /DIPEA (1:1) in 100  $\mu$ l DMF acetyliert. Anschließend wurden mit je 300  $\mu$ l 20% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppen gespalten. Zur Bestimmung der Kopplungsausbeuten wurde das Dibenzofluven-Piperidin in  $CH_2Cl_2$  UV-Vermessen ( $\epsilon_{301\text{ nm}} = 8550$ ).

Die abschließende Abspaltung des Peptids erfolgte mit 95% TFA, 3% Cystein, 2%  $H_2O$ . Das lyophilisierte Produkt wurde dann durch HPLC getrennt und durch FAB-MS nachgewiesen.

**Abkürzungsverzeichnis**

Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Bom	Benzyloxymethyl
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DIPC	Diisopropylcarbodiimid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
Etm	Ethylthiomethyl
FAB+	Fast Atom Bombardment, positive Ionen
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Massenspektroskopie
Mom	Methyloxymethyl
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Ptm	Phenylthiomethyl
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett-Spektroskopie



Fmoc-(Mom)Gly-OH

 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$ (ppm)	Aufspaltung	J (Hz)	Integral	Position
7,76	'd'	~7	2 H	9-H, 12-H
7,59	'd'	~6	2 H	
7,40	't'	~7	2 H	15-H, 18-H
7,31	't'	~6	2 H	
4,82/4,59	s-2		2 H	10-H, 11-H
4,55/4,39	d-2	6,0/7,0	2 H	16-H, 17-H
4,25	dt	~6,5/6,5	1 H	3-H
4,04/3,98	s-2		2 H	6-H
3,23/3,01	s-2		3 H	7-H
				2-H
				4-H

 $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$ (ppm)	Aufspaltung	Position
171,21/171,10	s-2	C-1
156,09/155,71	s-2	C-5
143,70	s	C-8, C-13
141,23/141,11	s-2	C-14, C-19
127,70	d	C-9 - C-12
127,10	d	
125,06/124,75	d-2	C-15 - C-18
119,90	d	
79,44/78,91	t-2	C-3
67,90/67,30	t-2	C-2
55,75/55,15	q-2	C-7
47,07	q	C-4
46,79/46,56	t-2	C-6

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dt = Dublett von Triplett, ' ' = mit Feinaufspaltung

## Patentansprüche

1. Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, dadurch gekennzeichnet,
  - (a) daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgruppe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist, und
  - (b), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Dipeptidbaustein handelt, auch das Wasserstoffatom der Peptidbindung durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein kann, oder
  - (c), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Oligopeptidbaustein handelt, auch ein bis alle Wasserstoffatome der Peptidbindungen durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein können.
2. Aminosäurebaustein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Baustein für eine einzelne Aminosäure, um einen Dipeptidbaustein oder um einen Oligopeptidbaustein handelt.
3. Aminosäurebaustein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der eine Peptidbindung einzugehen-

- 14 -

den Aminogruppe um eine alpha- oder beta-standige Aminogruppe handelt.

4. Aminosäurebaustein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der temporären Aminoschutzgruppe um eine Urethangruppe handelt, beispielsweise Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).
5. Aminosäurebaustein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Carboxylgruppe des Aminosäurebausteins frei, ebenfalls geschützt oder aktiviert (Aktivester) vorliegt.
6. Aminosäurebaustein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch eine weitere Schutzgruppe ( $R'''-X-CH_2-$ ), die unter Verwendung von Formaldehyd und einer H-aziden Verbindung ( $R'''-X-H$ ;  $R'''$ : Rest der Mannich-Reaktionskomponente), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise eines Alkohols ( $R'''-OH$ ), eines Thioalkohols ( $R'''-SH$ ) oder eines sekundären Amins ( $R'''-NR^{IV}H$ ;  $R^{IV}$ : weiterer Rest der Mannich-Reaktionskomponente, kein Wasserstoff), mit Hilfe der Mannich-Reaktion einführbar ist.
7. Verfahren zur Herstellung eines Aminosäurebausteins für die Peptidsynthese, dadurch gekennzeichnet, daß man von einem üblichen Aminosäurebaustein ausgeht, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzuziehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, und das andere Wasserstoff-Atom frei ist, und diesen üblichen Aminosäurebaustein einer Mannich-Reaktion unter Verwendung einer H-aziden Verbindung ( $R'''-X-H$ ), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist.



- 15 -

beispielsweise unter Verwendung eines Alkohols, eines Thioalkohols oder eines sekundären Amins, unterwirft.

8. Verwendung eines Aminosäurebausteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Peptidsynthese.
9. Verwendung nach Anspruch 8 bei der Peptidsynthese nach Merrifield.
10. Verwendung nach Anspruch 9 bei der Peptidsynthese nach Merrifield gemäß der Fmoc-tBu-Methode.

1/2

Fig. 1

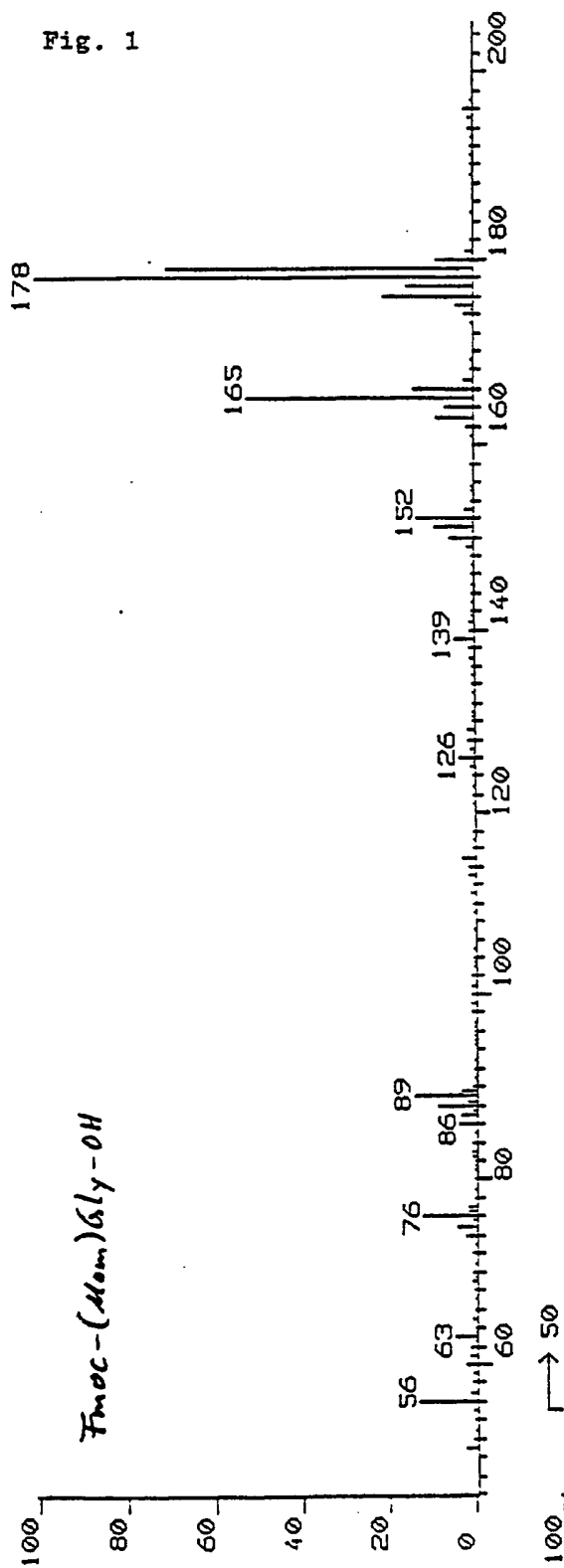
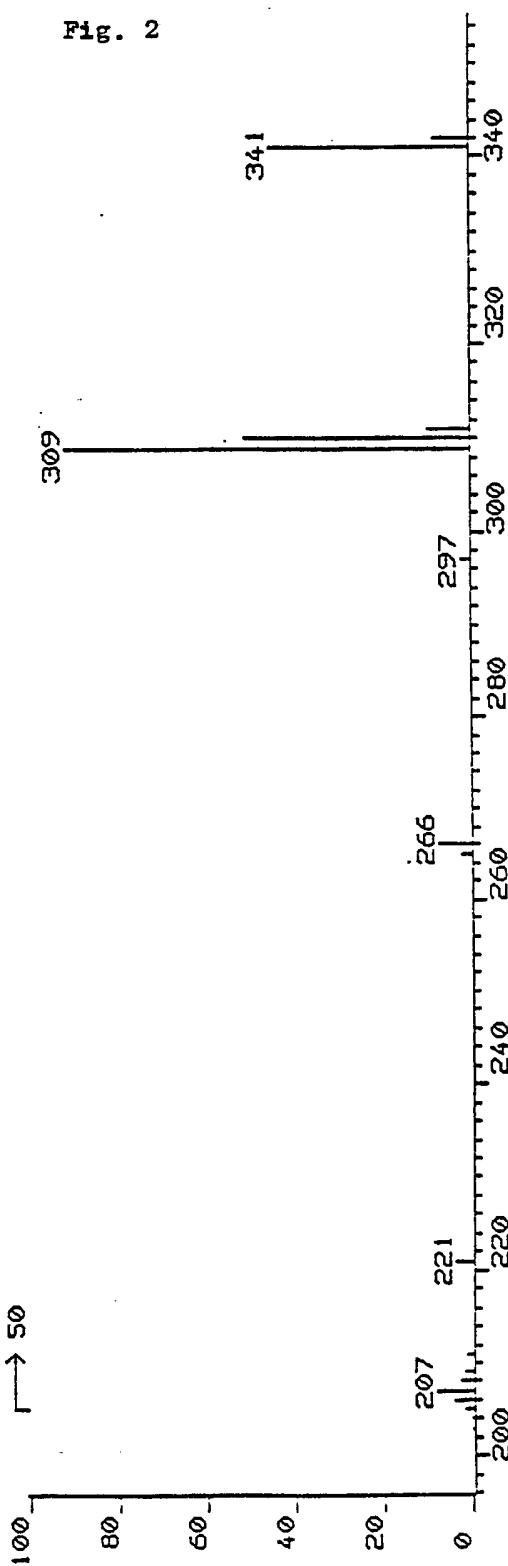
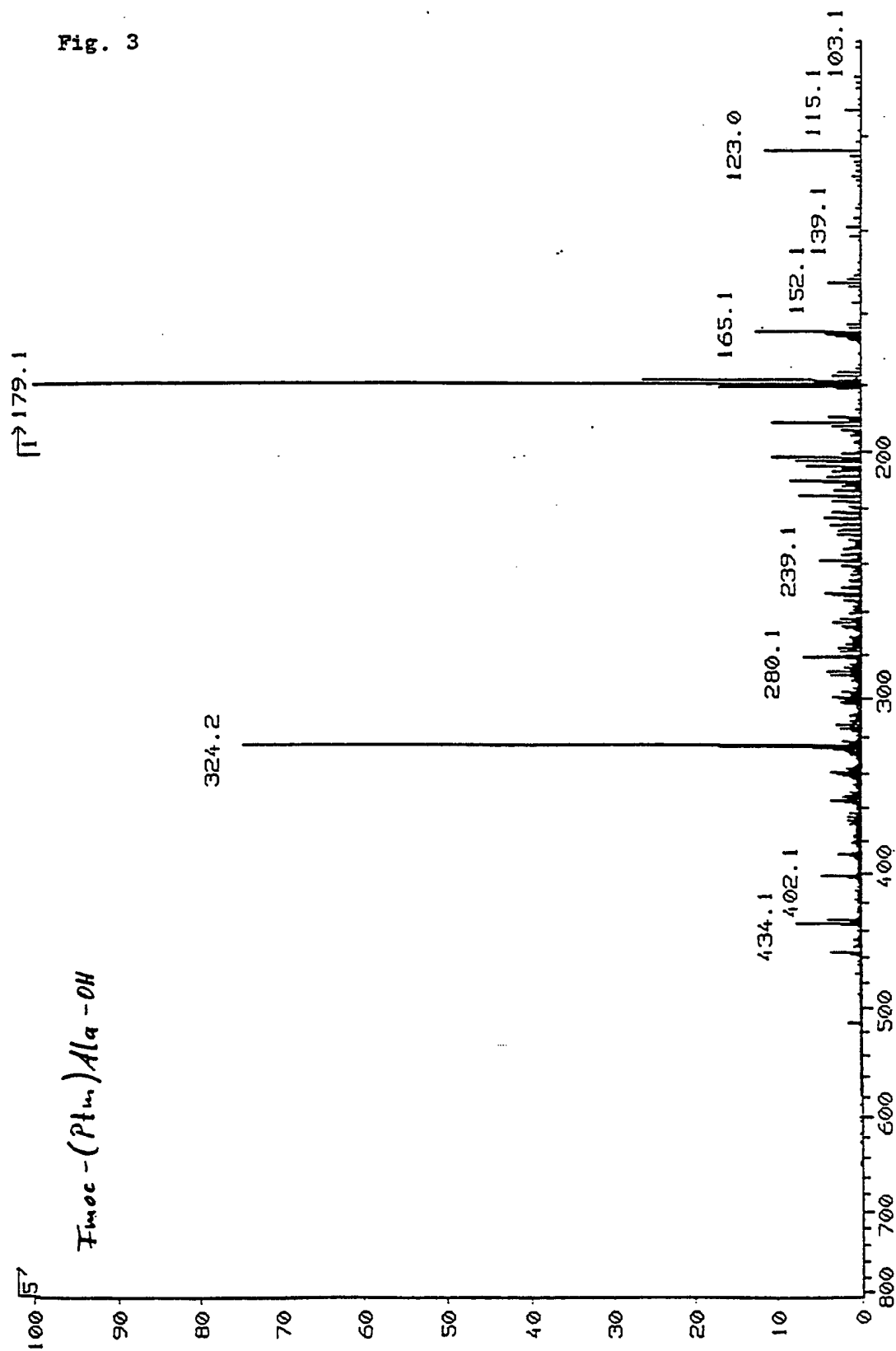


Fig. 2



2/2

Fig. 3



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01280

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>5</sup>: C 07 K 1/06; C 07 K 1/04; C 07 C 271/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup>: C 07 K; C 07 C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TETRAHEDRON LETTERS. vol. 22, No: 34, 1981, OXFORD GB pages 3249 - 3252; T SHONO ET AL.: 'a new carbon-phosphorus bond forming reaction and synthesis of aminoalkylphosphonic acid derivatives', see table II, compound 11 --	1
X	TETRAHEDRON LETTERS. No: 9, 1977, OXFORD GB pages 749 - 750; D H RICH AND J P TAM: 'a method for introducing secondary amide bonds into strained cyclic peptides' see the whole document, in particular compound No: 6 --	1
X	CHEMISTRY LETTERS. No: 8, August 1981, TOKYO JP pages 1121 - 1124; T SHONO ET AL.: 'one step synthesis of alpha - aminoalkylfurans and its application to a facile synthesis of pyridoxine (vitamine b6)' see the whole document, in particular table II, ./.	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 1991 (11.09.92)

Date of mailing of the international search report

14 October 1992 (14.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01280

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	compound 11 -- CHEMISTRY LETTERS. No: 11, November 1989, TOKYO JP pages 1963 - 1966; T SHONO ET AL.: 'a new facile method for construction of beta-arylpyrrolidine rings and its application to synthesis of racemic mesembrine' see compound 8 on page 1965	1
A	-- CH, A, 516 523 (SOGESPAR) 15 December 1971 see the whole document	1-10
P,X	-- PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY (J A SMITH AND J E RIVIER, EDS). PROCEEDINGS OF THE XII AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM, CAMBRIDGE, JUNE 16-21, 1991 ESCOM, LEIDEN Pages 505 - 506; R BARTL ET AL.: 'towards elimination of segment insolubility during SPPS' see the whole document	1-10

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9201280  
SA 60417**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 11/09/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CH-A-516523	15-12-71	None	
-----			

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Kl. 5 C07K1/06; C07K1/04; C07C271/22		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C07K ; C07C	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art. <sup>9</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	TETRAHEDRON LETTERS. Bd. 22, Nr. 34, 1981, OXFORD GB Seiten 3249 - 3252; T SHONO ET AL.: 'a new carbon-phosphorus bond forming reaction and synthesis of aminoalkylphosphonic acid derivatives' siehe Tabelle II, Verbindung 11 ---	1
X	TETRAHEDRON LETTERS. Nr. 9, 1977, OXFORD GB Seiten 749 - 750; D H RICH AND J P TAM: 'a method for introducing secondary amide bonds into strained cyclic peptides' siehe das ganze Dokument, insbesondere Verbindung nr. 6 --- -/-	1
<p><sup>9</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
11. SEPTEMBER 1992	10. 4. 10. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	p. masturzo	

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMISTRY LETTERS. Nr. 8, August 1981, TOKYO JP Seiten 1121 - 1124; T SHONO ET AL.: 'one step synthesis of alpha-aminoalkylfurans and its application to a facile synthesis of pyridoxine (vitamine b6)' siehe das ganze Dokument, insbesondere Tabelle II, Verbindung 11 ---	1
X	CHEMISTRY LETTERS. Nr. 11, November 1989, TOKYO JP Seiten 1963 - 1966; T SHONO ET AL.: 'a new facile method for construction of beta-arylpiperolidine rings and its application to synthesis of racemic mesembrine' siehe Verbindung 8 auf Seite 1965 ---	1
A	CH,A,516 523 (SOGESPAR) 15. Dezember 1971 siehe das ganze Dokument ---	1-10
P,X	PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY (J A SMITH AND J E RIVIER, EDS). PROCEEDINGS OF THE XII AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM, CAMBRIDGE, JUNE 16-21, 1991 ESCOM, LEIDEN Seiten 505 - 506; R BARTL ET AL.: 'towards elimination of segment insolubility during SPPS' siehe das ganze Dokument ---	1-10



EP 9201280  
SA 60417

11/09/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
CH-A-516523	15-12-71	Keine	

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82